

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年11月29日 (29.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/90375 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/56, 9/42, 1/15, 1/19,  
C12P 21/02, C11D 3/386, D06M 16/00

250-0852 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04272

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001年5月22日 (22.05.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-150463 2000年5月22日 (22.05.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 村島弘一郎 (MURASHIMA, Koichiro) [JP/JP]. 中根公隆 (NAKANE, Akitaka) [JP/JP]. 西村智子 (NISHIMURA, Tomoko) [JP/JP]. 古賀仁一郎 (KOGA, Jinichiro) [JP/JP]. 河野敏明 (KONO, Toshiaki) [JP/JP]; 〒350-0214 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama (JP). 隅田奈緒美 (SUMIDA, Naomi) [JP/JP]. 矢内耕二 (YANAI, Koji) [JP/JP]. 村上 健 (MURAKAMI, Takeshi) [JP/JP]; 〒

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ENDOGLUCANASE NCE5 AND CELLULASE PREPARATIONS CONTAINING THE SAME

(54) 発明の名称: エンドグルカナーゼ酵素NCE5及びそれを含んでなるセルラーゼ調製物

(57) Abstract: An enzyme endoglucanase which is usable in relieving hairiness, improving texture and appearance, clarifying color, topically changing color and relieving stiffness of cellulose-containing fibers and in detergent compositions and, further, useful in deinking waste paper, improving freeness of paper pulp, etc. A cDNA encoding the endoglucanase is cloned from *Humicola insolens* and its DNA sequence and an amino acid sequence deduced therefrom are determined.

(57) 要約:

セルロース含有繊維の毛羽立ちの低減、肌触りおよび外観の改善、色の澄明化、色の局所的変化、ごわつきの低減や洗剤組成物に使用される他、古紙の脱インキ、紙パルプのろ水性の改善等に有用なエンドグルカナーゼ酵素を提供する。フミコーラ・インソレンスからエンドグルカナーゼ酵素NCE5をコードするcDNAをクローニングして、そのDNA配列およびそれより推定されるアミノ酸配列を決定する。

WO 01/90375 A1

## 明細書

エンドグルカナーゼ酵素 N C E 5 及びそれを含んでなるセルラーゼ調製物  
技術分野

本発明は、エンドグルカナーゼ、エンドグルカナーゼを含んでなるセルラーゼ調製物、およびセルラーゼ調製物を用いるセルロース含有繊維の処理方法に関するものである。

### 背景技術

セルロース含有繊維に所望の特性を与えるために、セルロース含有繊維をセルラーゼで処理することが行われている。例えば、繊維業界においては、セルロース含有繊維の肌触り及び外観を改善するために、あるいは着色されたセルロース含有繊維にその色の局所的な変化を提供する「ストーンウォッシュ」の外観を与えるために、セルラーゼによる処理が行われている（ヨーロッパ特許第 307,564 号）。

現在、デニム染めセルロース含有繊維へのストーンウォッシュ外観の付与、肌触りの改善用途には、木材不朽菌であるトリコデルマ (Trichoderma) やフミコーラ (Humicola) 由来のセルラーゼが使用されている。これらセルラーゼは複数のセルラーゼ成分の混合物である。それらの実用化は、セルロース含有繊維に対して所望の効果を奏するには多量のセルラーゼ調製物を使用する必要から生じる困難性によって妨げられてきた。

上記のセルラーゼ調製物の短所は、多量のエンドグルカナーゼを含む調製物によって改善されつつある。例えば、エンドグルカナーゼ活性を増強したセルラーゼ調製物は、国際公開第 WO89/09259 号、国際公開第 WO91/17243 号、国際公開第 WO98/03640 号、及び国際公開第 WO94/21801 号で公表されている。特に、国際公開第 WO91/17243 号には、フミコーラ由来の精製された 43 kD エンドグルカナーゼ成分 (EGV) が、従来公知の複数のセルラーゼ成分の混合物であるセルラーゼ調製物の約 100 倍ものジーンズ脱色活性を有することが開示されている。また、国際公開第

WO98/03640 号には、フミコーラ由来のエンドグルカナーゼ成分である N C E 4 が、従来公知の複数のセルラーゼ成分の混合物であるセルラーゼ調製物の 25 倍のジーンズ脱色活性、100 倍ものリヨセル毛羽除去活性を有することが開示されている。

デニム染めセルロース含有繊維へのストーンウォッシュ外観の付与、肌触りの改善のために上記セルラーゼによる処理がおこなわれていたが、その場合、処理工程中で衣料にインジゴ染料の一部が再付着または逆染色、すなわち白場汚染してしまう等の問題が発生している。

汚染の度合いを低める試みには、セルラーゼ処理液中に界面活性剤等の試薬を添加し、インジゴ染料を分散させる方法がある。しかしながら、この方法は追加の化学品の経費を生じ、廃液の環境負荷を増大させるという問題がある。

したがって、デニム染めセルロース含有繊維への処理において、高活性でありながら白場汚染の度合いが低いセルラーゼが所望されていた。

#### 発明の開示

本発明者らは、今般、糸状菌であるフミコーラ・インソレンス(Humicola insolens)より、セルロース繊維を崩壊する高い活性を有する新規のエンドグルカナーゼ酵素 N C E 5 及びその遺伝子を単離し、また、この酵素の分子量が約 25 kDa と小さく、かつ、セルロース結合部位 (CBD) が構造中に存在しないというフミコーラ由来のセルロース繊維を分解する酵素としては例がない構造を有していることを示した。

また、酵素 N C E 5 をフミコーラ・インソレンス(Humicola insolens)を宿主として発現させて得た調製物を用いたデニム染めセルロース含有繊維への処理において、活性は N C E 4 と同等の高い活性を有する一方で、驚くべきことに白場汚染の程度が N C E 4 と比較して低いことを示した。

したがって、本発明は、デニム染めセルロース含有繊維への処理において、白場汚染の度合いが低いセルラーゼ及びその遺伝子の提供をその目的とする。

また、本発明は、良好な特性を有するセルラーゼ調製物の提供をその目的としている。

更に、本発明は、上記酵素を用いたセルロース含有繊維の効率的で安価な処理法の提供をその目的としている。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願 2000-150463 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

#### セルラーゼ

本発明によるエンドグルカナーゼ酵素 N C E 5 は、デニム染めセルロース含有繊維への処理において、白場汚染の程度が N C E 4 と比較して低いという有利な性質を有する。よって、本発明による酵素によれば、デニム染めセルロース含有繊維への処理における、界面活性剤等の化学品の添加量を低減し、その結果、コストの低減化を実用化し、環境への負荷への低減を達成しうる。

本酵素は S.Takashima らによる *H.grisea* の egl4 の配列 (S.Takashima et al./Journal of Biotechnology 67(1999)85-97) と相同性を示す、新規なタンパク質である。本酵素は分子量が約 25 kDa と小さく、かつ、セルロース結合部位 (CBD) が構造中に存在しないという特徴を有する。天然においては、糸状菌 *フミコーラ* から単離され、セルロース繊維を崩壊する高い活性を有している酵素は全てセルロース結合部位 (CBD) を有していた (例えば、国際公開第 WO91/17243 号には、*フミコーラ* 由来の精製された 43 kD エンドグルカナーゼ成分 (EGV)、国際公開第 WO98/03640 号には、*フミコーラ* 由来のエンドグルカナーゼ成分 (N C E 4))。しかしながら、天然においては、*フミコーラ* 由来で CBD が存在せずにセルロースを崩壊する高い活性を有する酵素は今までに知られていなかった。

*フミコーラ* 由来以外の酵素で、CBD が存在しないエンドグルカナーゼとして特表平 8-507695 には、トリコデルマ・ロンジブラシアトゥム

(*Trichoderma longibrachiatum*) から EGIII が単離され、CMCase 活性 (レマゾール・ブリリアント・ブルー・カルボキシメチルセルロースアッセイ) の至適 pH が 5.5~6.0 であり、従来知られていたトリコデルマ由来のセルラーゼと比較して中性からアルカリ領域でも高い活性を有していることが開示されている。一方、本発明における酵素の CMCase の至適 pH は 5.0 から 9.0 であり、EGIII と比較して更にアルカリ領域で高い活性を有していることを示した。

本酵素は、配列番号 1 に記載される配列の一部または、19~223 位の配列を有するタンパク質である。本発明にあって、配列番号 1 に記載される配列の一部とは、例えばプローブとして利用可能な程度の長さ、さらには、その一部の配列であっても依然としてセルラーゼ活性、とりわけエンドグルカナーゼ活性を維持するその部分配列を意味するものとする。

また、本発明には、上記タンパク質の N 末端に、更に配列番号 1 の 1~18 位のアミノ酸配列の一部または、全部を有するタンパク質も包含される。ここで、配列番号 1 の 1~18 位のアミノ酸配列は、シグナルペプチドと考えられることから、その一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果として N 末端に残る配列をも意味するものとする。

更に本発明には、前記タンパク質の改変タンパク質が含まれる。本発明において、改変タンパク質とは、上記のタンパク質のアミノ酸配列において、1 以上、好ましくは 1~数個のアミノ酸の付加、挿入、削除、欠失、または置換などの改変が生じたタンパク質であって、依然としてセルラーゼ活性、とりわけエンドグルカナーゼ活性を保持するものを意味する。

本発明による酵素は、糸状菌類、具体的には、フミコーラ属 (例えば、フミコーラ・インソレンス) の微生物から得ることができる。

本発明によれば、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質をコードするヌクレオチド配列が提供される。タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする DNA 配列は容易に定まり、よって、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質をコー

とする種々のヌクレオチド配列を選択することができる。

本発明によるヌクレオチド配列は、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよく、また、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものでもよい。本発明によるヌクレオチド配列の典型的な取得方法としては、フミコーラ・インソレンスの cDNA ライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば、部分アミノ酸配列の情報を基にして作製した適当な DNA プローブを用いて、スクリーニングを行う方法などが挙げられる。

本発明による、エンドグルカナーゼ NCE 5 のアミノ酸配列をコードする、典型的配列は、配列番号 2 に記載されるヌクレオチド配列の一部または全部を有するものである。配列番号 2 に記載されるヌクレオチド配列は、1～3 番の A T G で始まり、670～672 の T A A で終了するオープンリーディングフレームを有する。また、55 から 57 のヌクレオチド配列は 205 残基からなる前記成熟タンパク質の N 末端アミノ酸に対応する。

#### エンドグルカナーゼ活性

エンドグルカナーゼ活性は、一般的にカルボキシメチルセルロースを加水分解する活性である「CMCアーゼ活性」を意味する。「CMCアーゼ活性」は、被験タンパク質と CMC 溶液を一定時間インキュベーションした後、遊離してくる還元糖量を測定して、1 分間に 1  $\mu$ mol のグルコース相当の還元糖を生成する酵素量を 1 単位と定義する。また、被験タンパク質を加えた CMC 溶液の粘度変化を指標とした方法によっても「CMCアーゼ活性」を測定することができる。

本発明では、Neena Din らの方法 (Neena Din et al. Biotechnology 9 (1991) 1096-1099) に従い、脱脂綿からのフィブリルの遊離を指標としてエンドグルカナーゼ活性を測定する。すなわち、50mM リン酸緩衝液 (pH 7) 中に被験タンパク質とステンレスビーズと脱脂綿を加え、洗濯堅牢度試験機 (L-12、大栄科学精器製作所社製) にて 55°C、120 分間反応させた後、脱脂綿から遊離されるフィブリルの量を 600nm の吸光度にて測定する。

#### 発現ベクター及び形質転換された微生物

本発明においては、前記の本発明による配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質をコードする塩基配列（以下、単に「本発明による DNA 配列」という）を、宿主微生物内で複製可能で、かつ、その DNA 配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。本発現ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、本発現ベクターは、宿主微生物に導入されたとき、その宿主微生物のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。本発明によるベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望の活性を有するタンパク質を発現させるために、前記の本発明による DNA 配列の他に、その発現を制御する DNA 配列や微生物を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいるのが望ましい。発現を制御する DNA 配列としては、プロモーター及びターミネーター及びシグナルペプチドをコードする DNA 配列等がこれに含まれる。プロモーターは宿主微生物において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種若しくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御する DNA 配列として得ることができる。また、シグナルペプチドは、宿主微生物において、タンパク質の分泌に寄与するものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種若しくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から誘導される DNA 配列より得ることができる。また、本発明における遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。

更に、本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、糸状菌などを用いた系、及び、それらを用いた他のタ

ンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。

また、この発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。

更に、この形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から上記の本発明によるタンパク質を単離して得ることができる。したがって、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造方法が提供される。形質転換体の培養及びその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同等であってよい。また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。

また、本発明における好ましい態様によれば、本発明による DNA 配列によってコードされるエンドグルカナーゼ酵素を発現させ得る酵母細胞が提供される。本発明における酵母細胞としては、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、またはピキア (*Pichia*) 属に属する微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

本発明における宿主糸状菌は、フミコーラ (*Humicola*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属またはトリコデルマ (*Trichoderma*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属、またはアクレモニウム (*Acremonium*) 属に属するものであることができる。さらにそれらの好ましい例としては、フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 若しくはアスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*)、またはトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*)、フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、またはアクレモニウム・セルロリティカス (*Acremonium cellulolyticus*) が挙げられる。

#### 微生物の寄託

フミコーラ・インソレンス MN200-1 は、FERM BP-5977 (原寄託: FERM P-15736、原寄託日: 1996 年 7 月 15 日) の受託番号のもと、独立行政法人産業技術総合研究所 (日本国茨城県



つくば市東1丁目1番地1中央第6)に寄託されている。本発明によるセルラーゼ遺伝子を含むプラスミド pNCE5Bam (実施例4参照)で形質転換された大腸菌 JM109 株は、平成12年4月18日 FERM BP-7138 の受託番号のもと独立行政法人産業技術総合研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に寄託されている。

プラスミド pEGD01 を導入した大腸菌 (*Escherichia coli*/pEGD01) は FERM BP-5973 (原寄託: FERM P-15729、原寄託日: 1996年7月12日) の受託番号のもと独立行政法人産業技術総合研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に寄託されている。

#### セルラーゼの用途/セルラーゼ調製物

本発明の別の態様によれば、上記の本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、その改変ペプチドを含んでなるセルラーゼ調製物が提供される。本発明によるセルラーゼ調製物は、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、その改変ペプチドに、他のセルラーゼ、例えばセロビオヒドロラーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ及び本発明以外のエンドグルカナーゼを含めてもよく、更にセルラーゼ調製物に一般的に含まれる成分、例えば賦形剤 (例えば、乳糖、塩化ナトリウム、ソルビトール等)、界面活性剤、防腐剤等とともに混合され製造されてもよい。また、本発明におけるセルラーゼ調製物はいずれか適当な形状、例えば粉末または液体状に調製することができる。

更に本発明によれば、着色セルロース含有繊維の澄明化をもたらす方法であって、エンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で着色セルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる方法、並びに、着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化をもたらす方法、すなわち、着色セルロース含有繊維にストーンウォッシュの外観を与える方法が提供される。そして、この方法は、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物により着色セルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる。

本発明による上記方法は、洗濯中にセルロース含有繊維を処理すること

により実施できる。しかしながら、繊維の処理は、場合によって、ソーキングまたはすすぎ中に、繊維が浸漬されているかまたは浸漬されうる水に、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物を添加することによって実施されてもよい。

更に本発明によれば、セルロース含有繊維の毛羽立ち始める速度を低減するか、毛羽立ちを低減するか、肌触りが悪くなる速度を低減するか、またはごわ付きを低減する方法が提供される。この方法は、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、またはセルラーゼ調製物によりセルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる。

接触温度、エンドグルカナーゼ酵素の量などの条件は、他の種々の条件を勘案して適宜決定されてよいが、例えば、セルロース含有繊維の肌触り及び外観の改善を目的とした減量加工の場合、50～60℃程度の温度で、1～100 mg/L のタンパク濃度のエンドグルカナーゼを使用することにより処理することができる。更に、着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化をもたらす場合、50～60℃程度の温度で、2～50 mg/L のタンパク濃度のエンドグルカナーゼを使用することにより処理することができる。

また、セルロース含有繊維の毛羽立ち始める速度を低減するかまたは毛羽立ちを低減する場合、50～60℃程度の温度で、0.05～10 mg/L のタンパク濃度のエンドグルカナーゼ酵素を使用することにより処理することができる。

また、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物を洗剤組成物中で用いることにより、粒質土壌除去、色彩澄明化、脱毛羽立ち、脱ピリング及び手粗さ軽減に関し、それらを改善することができる。本発明が定義する洗剤組成物は、界面活性剤（アニオン性、ノニオン性、カチオン性、両性または双性イオン性あるいはそれらの混合物であり得る）をも含有し得る。

更に、本発明の洗剤組成物は、当分野で既知の他の洗剤成分、例えば、ビルダー、漂白剤、漂白活性剤、腐食防止剤、金属イオン封鎖剤、汚れ解離ポリマー、香料、他の酵素（プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼなど）、

酵素安定剤、製剤化補助剤、蛍光増白剤、発泡促進剤等をも含有し得る。代表的なアニオン性界面活性剤は直鎖状アルキルベンゼンスルホネート (LAS)、アルキルスルフェート (AS)、アルファーオレフィンスルホネート (AOS)、アルコールエトキシスルフェート (AES) 及び天然脂肪酸のアルカリ金属塩等がある。ノニオン性界面活性剤の例としてはポリオキシエチレンアルキルエーテル (AE)、アルキルポリエチレングリコールエーテル、ノニルフェノールポリエチレングリコールエーテル、スクロース、及びグルコースの脂肪酸エステル、並びにポリエトキシ化アルキルグルコシドのエステル等がある。

本発明によるエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物は古紙に作用させることにより、脱インキが可能であることが見出された。これより、古紙から再生紙をつくる過程において本発明によるエンドグルカナーゼ酵素による処理で有意に改善できる。本発明に用いられる古紙は、一般に言われる古紙は全て用いることができ、例えば機械パルプ、化学パルプを配合した新聞古紙、雑誌古紙、下級～中級印刷古紙、化学パルプよりなる上質古紙、これらの塗工紙等の印刷古紙が含まれる。

また、本発明に言う脱インキ薬品は、一般に古紙の脱インキに用いられる薬品をいい、NaOH、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>などのアルカリ、珪酸ソーダ、過酸化水素、リン酸塩、それにアニオン系、ノニオン系の界面活性剤、オレイン酸等の補集材、助剤として pH 安定剤、キレート剤、分散剤等が挙げられる。

また、本発明によれば、紙パルプのろ水性が、強度の著しい低下を伴うことなく、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素による処理で有意に改善できるものと考えられる。したがって、本発明によれば、パルプのろ水性の改善方法であって、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で紙パルプを処理する工程を含んでなる方法が提供される。本発明で処理できるパルプの例としては、古紙パルプ、再循環板紙パルプ、クラフトパルプ、亜硫酸パルプまたは加工熱処理及び他の高収率パルプが挙げられる。

更に、本発明によるエンドグルカナーゼを動物飼料中で用いることによ

り、飼料中のグルカンの消化能を改善することができる。したがって、本発明によれば、動物飼料の消化能を改善する方法であって、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で動物飼料を処理する工程を含んでなる方法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、プラスミド pNCE5Bam の構成を表す。

図 2 は、プラスミド pJND-c 5 の構成を表す。

#### 実施例

本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

#### 〔実施例 1〕フミコーラ・インソレンスからの脱脂綿フィブリル遊離活性を有する成分の単離精製

フミコーラ・インソレンス MN200-1 (FERM BP-5977) を、(N) 培地 (5.0% アビセル、2.0% 酵母エキス、0.1% ペプトン、0.03% 塩化カルシウム、0.03% 塩化マグネシウム、pH 6.8) に植菌し、37°C で振とう培養した。7 日間培養の後、得られた培養液を 7000 rpm で 20 分間遠心することにより菌体を除き、培養上清液を粗精製セルラーゼ調製液とした。

この、粗精製セルラーゼ調製液 200 ml を、最終濃度 1 M 硫酸アンモニウムの溶液になるように調整した後、あらかじめ 1 M の硫酸アンモニウム液で平衡化させた、Source PHE カラム (ゲル体積 150 ml、Amersham Pharmacia Biotech 社製) に流速 20 ml/min でアブライした。次に 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、硫酸アンモニウム濃度を 1.0 M から 0 M に直線勾配溶出法により流速 20 ml/min で溶出し、分画した。このうち、硫酸アンモニウム濃度が 0.3 M のときに得られた画分の一部に脱脂綿フィブリル遊離活性が強く認められた。そこで、この画分 200 ml を分取した。

これを2回実施した。

ここで、得られた活性画分 400 ml を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で硫酸アンモニウム 1.5 M となるように調整した後、あらかじめ 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、硫酸アンモニウム濃度 1.5 M 溶液で平衡化させた、Source ISO カラム (ゲル体積 125 ml、Amersham Pharmacia Biotech 社製) に流速 20 ml/min でアプライした。次に 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、硫酸アンモニウム濃度を 1.5 M 溶液から超純水に対して、直線勾配溶出法により流速 20 ml/min で溶出し、分画した。このうち、硫酸アンモニウム濃度が 1.05 M のときに得られた画分の一部に脱脂綿フィブリン遊離活性が強く認められた。そこで、この画分 200 ml を分取した。

更に、得られた活性画分 200 ml に対して硫酸アンモニウムを 65% 飽和となるように加え、4℃で 60 分間攪拌した後、15000 rpm で遠心し、沈澱を回収した。この沈澱を 20 ml の蒸留水に溶解し、ウルトラフリー/Biomax-5K (ミリポア社) を用いて、脱塩を行い、40 ml の溶液を回収した。

ここで、更に、得られた活性画分のうち 30 ml 分を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) になるように調整した後、あらかじめ 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で平衡化させた、SP Sepharose FF カラム (ゲル体積 16 ml、Amersham Pharmacia Biotech 社製) に流速 5 ml/min でアプライした。次に 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) から 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中 1 M NaCl に対して、直線勾配溶出法により流速 4 ml/min で溶出し、分画した。このうち、NaCl 濃度が約 0.12 M のときに得られた画分の一部に脱脂綿フィブリン遊離活性が強く認められた。そこで、この画分 12 ml を分取した。

更に、得られた活性画分のうち 6 ml 分を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) になるように調整した後、あらかじめ 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で平衡化させた、MonoS 5/5HR カラム (Amersham Pharmacia Biotech 社製) に流速 1 ml/min でアプライした。次に 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) から 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中 1 M NaCl に対して、直線勾配溶出法により流速 1 mL/min で溶出し、分画した。このうち、NaCl 濃度が約 0.1 M のときに

得られた画分の一部に脱脂綿フィブリル遊離活性が強く認められた。そこで、この画分 1 ~ 3 ml を分取した。この画分を N C E 5 として単離した。この N C E 5 は SDS-PAGE において 25kD の単一なバンドを示した。ここまでの N C E 5 の精製の工程を 50 回繰り返し、精製サンプルを大量に得た。

SDS-PAGE はテフコ社のシステムを用いて実施した。すなわち、電気泳動槽 (No.03-101)、電源 (Model:3540)、ゲル 8 % (01-015)、SDS-PAGE 用バッファーキット (06-0301) を用いた。泳動条件は、18 mA/10 分、次いで 20 mA/90 分であった。泳動後のタンパク質の検出には、電気泳動用 2D-銀染色試薬・II「第一」(第一化学薬品社製)を用いて銀染色を行った。マーカーとしての標準タンパク質は、バイオ・ラッド社の SDS-PAGE 分子量標準タンパク質・Low Range (161-0304) を用いた。

脱脂綿フィブリル遊離活性は Neena Din らによる方法(Neena Din et al. Biotechnology 9 (1991) 1096-1099)を改良した方法で行なった。すなわち、洗濯堅牢度試験機を用いて以下の条件で反応させた場合の脱脂綿から遊離される毛羽の量を 600 nm 吸光度にて測定した。

試験機械：洗濯堅牢度試験機 L-12 (大栄科学精器製作所社製)

温度：55℃

時間：120分

反応pH：pH 7 (50 mM 燐酸緩衝液)

処理液には、エンドグルカナーゼ溶液とともにステンレスビーズと脱脂綿を適当量加えた。

## 〔実施例 2〕 セルラーゼ N C E 5 の部分アミノ酸配列

### (1) N 末端アミノ酸配列の同定

実施例 1 において精製したタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定するため、N C E 5 画分を SDS-PAGE mini (テフコ社製) を行った後、PVDF 膜へエレクトロブロッティングし、クマジーブリリアントブルー R 2 5 0 (ナカライテスク社製) で染色した後、脱色し、水で洗浄し、風乾した。ここから分子量 25 kDa のタンパク質がプロットされた部分を切

り出し、プロテインシーケンサーModel 492 (PE Applied Biosystems 社製) に供し、N末端アミノ酸配列の解析を試みたが、エドマン分解によるシグナルは得られず、N末端のアミノ酸が修飾保護されていることが判明した。そこで、0.5%ポリビニルピロリドン(分子量 40,000、Sigma 社製)/100mM 酢酸溶液に 37°C、30 分浸漬し、膜上のタンパク質未結合部分をブロックした後、Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase (宝酒造株式会社製) で 50°C、5 時間処理することにより修飾 N 末端残基を除去し、あらためてシーケンシングを行った。得られた配列は以下の通りであった。

NCE 5 の N 末端アミノ酸配列

Ser-Gly-Ser-Gly-Arg-Thr-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-(Cys)-(Cys)-Lys-Pro-  
Ser-(Cys)-Ala-Trp-Pro (20 残基) (配列番号 3)

## (2) ペプチドマッピング

実施例 1 において精製されたタンパク質のインターナルアミノ酸配列を決定するため、還元アルキル化した後、ペプチドマッピングを行った。

つまり、チューブにて 300  $\mu$ g の精製されたタンパク質を 500  $\mu$ L の還元アルキル化用緩衝液 (0.5 M トリス、7 M グアニジン塩酸塩、10 mM EDTA  $\cdot$  2 Na<sub>2</sub>) に溶解した後、DTT 1 mg を加えた。チューブ中の空気を窒素で置換し、室温で 5 時間保持し、タンパク質の還元を行った。還元反応の後、モノヨード酢酸 2.5 mg を加え、遮光中、室温で 30 分間、アルキル化反応を行った。反応終了後、脱塩のために蒸留水に対して透析を行い、凍結乾燥後、得られた粉末を還元アルキル化 NCE 5 とした。

この粉末を 0.1 M 重炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) に溶解した。タンパク質に対し約 1/50 モル量のトリプシン (Promega 社製) を添加し、37°C、一晩反応させた。同分解産物を Model 172  $\mu$  プレパラティブ HPLC システム (PE Applied Biosystems 社製) を用いてカラムクロマトグラフィー (カラム: C18 220 $\times$ 2.1mm、0.1% TFA、5% アセトニトリル $\sim$ 0.085% TFA、35% アセトニトリルグラジェント) を行い、5 種のペプチドを分取した。得られたペプチド断片のアミノ酸配列は、プロテインシーケンサー Model 492 (PE Applied Biosystems 社製) により決定した。その結果は

以下の通りであった。

T-28.8 : Leu-Lys-Pro-Gly-Cys-Tyr-Trp-Arg (8 残基) (配列番号 4)

T-32.6 : Tyr-Trp-Asp-Cys-Cys-Lys (6 残基) (配列番号 5)

T-35.9 : Trp-Asp-Asn-Pro-Leu-Phe-Asp-Gly-Gly-Asn-Thr-Arg (12 残基) (配列番号 6)

T-39.8 : Gln-Trp-Cys-Cys-Ala-Cys-Tyr-Glu-Leu-Thr-Phe-Thr (12 残基)  
(配列番号 7)

T-43.0 : Phe-Asp-Trp-Phe-Leu-Asn-Ala-Asp-Asn-Pro-Ser-Val-Asn-

\* \* \* \* \*

Trp-Arg (15 残基) (配列番号 8)

これらN末端アミノ酸配列及びペプチドマッピングによって得られたアミノ酸配列のうち4個のペプチドは、S.Takashima らによるフミコーラ・グリセアの egl4 の配列 (S.Takashima et al./Journal of Biotechnology 67(1999)85-97)と同一であった。しかし、T-43.0 においては同一配列は認められなかった。よって相同性を示す配列はあるものの、同一ではなく、新規なタンパク質であることが示唆された。

### [実施例 3] セルラーゼNCE5のcDNAのクローニング

#### (1) cDNAの単離とライブラリーの作成

セルラーゼ成分NCE5遺伝子のスクリーニングには、フミコーラ・インソレンス MN200-1 から mRNA を調製し、逆転写酵素により cDNA を合成しライブラリーを作製した。

##### ① 全 RNA の調製

フミコーラ・インソレンス MN200-1 を実施例 1 に記載した (N) 培地で 2 日間培養し、菌体を遠心分離 (3500rpm, 10 分) により回収した。そのうち 3g の菌体を滅菌水で洗浄し、液体窒素で凍結後、乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で磨砕した。この磨砕した菌体から ISOGEN (ニッポンジーン社製) により、添付のマニュアルに従い全 RNA を単離し、ホルムアルデヒド・アガロースゲル電気泳動法により染色像として全 RNA を確認した。



## ② ポリ A テイル+RNA (=mRNA) の調製

①で調製した全 RNA のうち 1mg から、mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用い、添付のマニュアルに従い、オリゴ (dT) セルロースカラムにアプライし mRNA を溶出単離した。更に、ホルムアルデヒド・アガロースゲル電気泳動法によりスメアーな染色像として mRNA を確認した。

## ③ cDNA の合成

②で調製した mRNA の 5  $\mu$ g から、Time Saver cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用い、添付のマニュアルに従い、cDNA 合成を行った。

## ④ cDNA ライブラリーの作製

合成した全 cDNA の平滑末端に前述の Time Saver cDNA Synthesis Kit に含まれている EcoRI-NotI アダプターを、添付マニュアルに従い連結した。この DNA 断片の全量を、ファージベクター、 $\lambda$  ZAPII クローニングキット (ストラタジーン社製) の EcoRI アームに DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造株式会社製) を用い連結させ、エタノール沈澱後、TE (10 mM トリス塩酸 pH 8.0, 1 mM EDTA) 緩衝液に溶解した。このようにして得られた組換えファージベクターを、Gigapack III Plus Packaging Extract (ストラタジーン社製) により添付のマニュアルにしたがって *in vitro* パッケージングを行った。その後、この組換えファージを大腸菌 XL1-Blue MRF' に感染させ、プレートにて培養しプラークを形成させ、ファージライブラリーとした。これを用いて目的遺伝子をクローニングした。

## (2) PCR 法による DNA の増幅と解析

(1)・③で作製した cDNA を鋳型にし、実施例 2 の部分アミノ酸配列の情報をもとに PCR 法により DNA を増幅した。

各プライマーは、N 末及びペプチド T-43.0 の\*で示したアミノ酸配列に対応する、以下のような合成オリゴヌクレオチドを作製した。

N 末 : 5'-TAY TGG GAY TGY TGY AAR CC-3' (20mer) (配列番号 9)

T-43.0 : 5'-TCI GCR TTI ARR AAC CAR TC-3' (20mer) (配列番号 10)

PCR は、50  $\mu$ l の反応液中、1  $\mu$ g の cDNA を鋳型とし、1.25unit の LA Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造株式会社製）と添付の緩衝液、0.2mM dNTP、10%DMSO、及び 1  $\mu$ M の各プライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94°C 1 分間、(94.0°C 30 秒間、55.0°C 30 秒間、72.0°C 1 分間) X 25 回、72.0°C 5 分間。

この反応により約 500 bp の DNA が増幅され、これを DYEnamic ET terminator cycle sequencing premix kit (Amersham Pharmacia Biotech 社製) と ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems 社製) を用いて、添付のプロトコールに従いシーケンスを行った。その結果、決定された塩基配列から推定されるアミノ酸配列には、実施例 2 で得られた部分アミノ酸配列を全て含んでいた。よって、以降のスクリーニングのプロープとして用いた。

### (3) セルラーゼ成分 NCE 5 遺伝子のクローニング

#### ① プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニング

PCR 法により増幅させた 500 bp の DNA 断片 100ng を、あらかじめ ECL ダイレクト DNA/RNA ラベリング検出システム (Amersham Pharmacia Biotech 社製) により、標識化した。

(1)-④で作製したファージプラークは、Hybond-N+ナイロントランスファーマンブラン (Amersham Pharmacia Biotech 社製) に写し取り、0.4 N 水酸化ナトリウムでアルカリ処理し、メンブラン上の組換えファージ DNA を 1 本鎖に変成後、5  $\times$  SSC (1  $\times$  SSC : 15 mM クエン酸 3 ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、風乾させ DNA を固定した。その後、キットのマニュアルにしたがって、ハイブリダイゼーションを行い、検出反応をし、FUJI MEDICAL X-RAY FILM (富士写真フイルム社製) に感光させ、6 個の陽性クローンを得た。

#### ② ファージ DNA の調製

陽性クローンからの DNA の調製は、キットの添付マニュアルに従い、

プラスミド DNA として調製した。

アンピシリンに耐性を示す大腸菌 SOLR<sup>TM</sup> から、pBluescript SK (－) に DNA 断片がクローン化されたプラスミドを調製し、これをテンプレートに(2)で使用したN末端と T-43.0 のプライマーを用い、前述と同様の条件下でPCRを行った。その結果、1個のプラスミドにおいて500 bpの増幅産物を得られた。よって、このプラスミドに目的とするDNAがクローン化されていることが予測されたので、これをEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。

その結果、約1kbpのEcoRI断片を含んでいた。

#### (4) cDNA 塩基配列の決定

(3)の②において得られた陽性組換え pBluescript SK (－) プラスミドに挿入された約1 kbpのEcoRI断片の塩基配列は、T3、T7シーケンス用プライマーを使用し、前述と同様の方法で決定した。結果、この塩基配列は672 bpのORFを含んでおり、その塩基配列、及びORFから推定されるアミノ酸配列はそれぞれ、配列表の配列番号2、及び配列番号1に示した。

また、この予測されるタンパク質のN末端から18アミノ酸以降の配列は、実施例2の(1)において決定した25 kDaのタンパク質のN末端配列に一致し、故に本遺伝子は25 kDaのタンパク質をコードしていることが明らかとなった。

更にこのORFの1～18アミノ酸の配列については、本タンパク質を細胞外に分泌させるためのシグナル配列であると考えられた。

#### [実施例4] NCE5遺伝子のフミコーラ・インソレンスでの発現

フミコーラ・インソレンス MN200-1 における発現ベクターは、国際公開第WO 00/24879号に記載の方法にしたがって得られたプラスミド pJD01 を利用し以下のように構築した。

##### (1) NCE5発現プラスミド pJND-c5 の構築

##### ① NCE5遺伝子への部位特異的変異導入

NCE 5 遺伝子は、プラスミド pJD01 の BamHI 部位に連結できるように、開始コドンのすぐ上流の配列と終止コドンのすぐ下流にあらかじめ BamHI を含む形でプライマーを設計し、PCR 法にて増幅した。変異導入用プライマーは以下のようにデザインした。

NCE 5-N-BamHI

5' -GGGGATCCTGGGACAAGATGCAGCTCCCCCTGACCACG-3'  
(38mer) (配列番号 11)

NCE 5-C-BamHI

5' -GGGGATCCTGCATTAAACGCGAGCAGCCGCTCTTGGCC-3'  
(38mer) (配列番号 12)

PCR の反応は、実施例 3 で得られた陽性組換え pBluescript SK (－) プラスミドをテンプレートに前述と同様の条件下で行った結果、1.0%アガロースゲル電気泳動にて約 670 bp の DNA 断片の増幅産物を確認したので、Micro Spin S-400 HR Columns (Amersham Pharmacia Biotech 社製) にて未反応物を除去しエタノール沈澱後、BamHI にて消化した。次に、全量を 1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、670 bp の DNA 断片を Sephaglas BandPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて添付のマニュアルに従い回収し、その BamHI 断片をプラスミド pUC118 の BamHI 部位にサブクローニングし、図 1 に示されるプラスミド pNCE5Bam を得た。更に、この挿入断片について前述の方法にて塩基配列を決定し、確認した。

## ② プラスミド pJND-c5 の作製

国際公開第 WO 00/24879 号記載のプラスミド pJD01 を BamHI にて消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動により分離し、約 8.0 Kbp の DNA 断片を前述の Sephaglas BandPrep Kit にて回収し、これを大腸菌由来のアルカリフォスファターゼ (宝酒造株式会社製) を用い添付のマニュアルに従い脱リン酸化した。また、①で得られたプラスミド pNCE5Bam においても同様に BamHI にて消化し、670 bp の DNA 断片を回収しそれぞれを DNA Ligation Kit Ver.2 にて連結し、図 2 に示される発

現プラスミド pJND-c5 を得た。

(2) プラスミド pJND-c5 によるフミコーラ・インソレンスの形質転換

フミコーラ・インソレンス MN200-1 を(S)培地中 37°Cで培養し、24 時間後、3000rpm、10 分間遠心分離により集菌した。(S)培地の組成は、実施例 1 に記載した(N)培地にグルコース (3.0%) を加え、アビセルを除いたものである。得られた菌体を 0.5 M シュークロースで洗浄し、0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過したプロトプラスト化酵素溶液 (3 mg/ml  $\beta$ -glucuronidase、1mg/ml Chitinase、1mg/ml Zymolyase、0.5 M シュークロース) 10ml に懸濁した。30°Cで 60~90 分間振盪し、菌糸をプロトプラスト化させた。この懸濁液を濾過した後、2500 rpm、10 分間遠心分離してプロトプラストを回収し、SUTC 緩衝液 (0.5 M シュークロース、10 mM 塩化カルシウム、10 mM トリス塩酸 (pH 7.5) ) で洗浄した。

以上のように調製したプロトプラストを 1 mL の SUTC 緩衝液に懸濁し、この 100  $\mu$ L に対し 10  $\mu$ g の DNA (TE) 溶液 (10  $\mu$ l) を加え氷中に 5 分間静置した。次に、400  $\mu$ L の PEG 溶液 (60% PEG4000、10mM 塩化カルシウム、10 mM トリス塩酸 (pH 7.5) ) を加え、氷中に 20 分間静置した後、10 ml の SUTC 緩衝液を加え、2500rpm、10 分間遠心分離した。集めたプロトプラストを 1 mL の SUTC 緩衝液に懸濁した後、4000 rpm で 5 分間遠心分離して、最終的に 100  $\mu$ L の SUTC 緩衝液に懸濁した。

以上の処理を加えたプロトプラストを、ハイグロマイシン (200  $\mu$ g/ml) 添加 YMG 培地 (1% グルコース、0.4% 酵母エキス、0.2% モルトエキス、1% 寒天 (pH 6.8) ) 上に、YMG 軟寒天とともに重層し、37°C、5 日間培養後、形成したコロニーを形質転換体とした。

〔実施例 5〕 pJND-c5 の形質転換体の培養及び同定

(1) SDS-PAGE による評価

前述のようにプラスミド pJND-c5 をフミコーラ・インソレンス MN200-1 に導入し、ハイグロマイシン耐性を示す株を 40 株選抜した。これらを(N)培地で 37°Cで 5 日間培養し、得られた培養上澄を 12%-SDS-PAGE mini(テ

フコ社製) 電気泳動により解析したところ、12 クローンにおいてNCE5と推定される 25 kDa タンパク質が、特に増強されていた。

## (2)組換えNCE5のN末端アミノ酸残基の同定

(1)で大量発現したタンパク質がNCE5 遺伝子由来であることを確認するために、N末端アミノ酸配列を決定した。まず、培養上澄について 12% SDS-PAGE mini 電気泳動にて分離し、実施例 2 の方法にしたがって PVDF 膜にタンパク質を電氣的に写し取り、分子量 25 kDa のタンパク質について、修飾N末端残基を除去し、プロテインシーケンサーに供した。その結果、プラスミド pJND-c5 の塩基配列から推定されるセルラーゼNCE5のN末端アミノ酸配列と一致した。

## 〔実施例 6〕 フミコーラ・インソレンスで発現させたNCE5によるデニム染めセルロース含有繊維の脱色活性評価

実施例 5 で得られたNCE5 遺伝子を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液、NCE4 遺伝子を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液及びフミコーラ・インソレンス培養液を用いて、糊抜きした12オンスのブルージーンズパンツを下記の条件で脱色処理をした。NCE4 遺伝子を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液は、国際公開第WO 98/03640 号 の記載に従ってフミコーラ・インソレンス MN200-1 に発現プラスミド pEGD01 を導入することによって得られた形質転換体を、(N)培地にて 37℃で5日間振とう培養して得られたものを用いた。フミコーラ・インソレンス培養液は、フミコーラ・インソレンス MN200-1 を(N)培地にて 37℃で5日間振とう培養して得られたものを用いた。

試験機械：20kg ワッシャー（三洋電機株式会社製 全自動洗濯機 SCW5101）

温度：65℃

時間：60 分

pH：6.2（6.7 mM リン酸緩衝液）

処理液には、セルラーゼ調製液とともにゴムボールを適当量加えた。

脱色度を分光測色計（ミノルタ社製 CM-525 i）を用い、Lab表示系の L 値（明度）を測定した。コントロール（未処理繊維）に対する L 値の増加（白色度の増加）＝ $\Delta L$  値を求め、この  $\Delta L$  値により脱色の度合いを評価した。すなわち、各試験区につき 10 点の  $\Delta L$  値を測定し（ $n=10$ ）、その平均値を算出した。そして、 $\Delta L$  値＝約 6 となるのに必要なエンドグルカナーゼのタンパク濃度を算出した。

タンパク濃度はプロテインアッセイキット（バイオラッドラボラトリー社製）を用い、牛血清アルブミンで標準曲線を作製し定量した。

その結果は、次の第 1 表に記載の通りであった。

第 1 表

試料	タンパク濃度
フミコーラ・インソレンス培養液	80.0 mg/L
NCE 4 を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液	6.0mg/L
NCE 5 を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液	6.0mg/L

〔実施例 7〕 フミコーラ・インソレンスで発現させた NCE 5 によるデニム染めセルロース含有繊維の脱色時の白場汚染評価

実施例 5 で得られた NCE 5 遺伝子を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液、NCE 4 遺伝子を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液について、種々の温度でデニム染めセルロース含有繊維の脱色を行った。添加酵素濃度は、65℃で、 $\Delta L$ ＝約 6 となるのに必要な量とした。

白場汚染の評価は、デニム染めセルロース含有繊維に縫い付けた白色木綿布の試験後の白色度を分光測色計（ミノルタ社製 CM-525 i）を用い、Lab 表示系の L 値（明度）を測定した。L 値が大きいほど白色布が白く、白場汚染の程度が低いことが示される。

その結果は、下記の第 2 表に示される通りであった。いずれの反応温度においても、NCE 5 は NCE 4 と比較して、脱色の程度が大きいのに対して、白場汚染の程度は低く、NCE 5 が白場汚染の程度が低いことは、

この結果より明らかである。

第 2 表

酵素	反応温度	脱色の程度 ( $\Delta L$ )	白場汚染の程 (L)
N C E 5	65°C	6.00	74.99
	55°C	8.32	75.10
	45°C	7.74	75.33
N C E 4	65°C	5.88	74.53
	55°C	7.29	74.17
	45°C	6.30	74.56

〔実施例 8〕 洗濯堅牢度試験機によるフミコーラ・インソレンスで発現させた N C E 5 の再生セルロース系繊維に対する毛羽除去作用の評価

実施例 5 で得られたフミコーラ・インソレンスで発現させた N C E 5 の、再生セルロース系繊維の代表例であるリヨセルの毛羽除去活性を以下のよう

に評価した。

あらかじめ染色されたりヨセルニットの生地（豊島株式会社製）を界面活性剤及びゴムボールとともに大型ワッシャー中で毛羽立たせた。その後、この毛羽立たせたりヨセルニットの生地（豊島株式会社製 10cm×10cm）を下記の条件でリヨセルの毛羽除去処理を行なうことにより、形成された毛羽が完全に除去されるのに要するフミコーラ・インソレンスで発現させた N C E 5 のタンパク濃度を算出した。

試験機械：洗濯堅牢度試験機 L-12（大栄科学精器製作所社製）

温度：55°C

時間：60 分

反応液量：40 ml

反応 pH：pH 5（10 mM 酢酸緩衝液）

処理液には、エンドグルカナーゼ溶液とともにゴムボールを適当量



加えた。

その結果は、6 mg/L のタンパク濃度の添加量で毛羽が完全に除去されることが明らかとなった。

〔実施例 9〕 洗剤として配合した場合のフミコーラ・インソレンスによって発現された N C E 5 の綿毛羽除去作用の評価

実施例 5 で得られたフミコーラ・インソレンスによって発現された N C E 5 の、綿の毛羽除去活性を以下のように評価した。すなわち、実施例 5 で調製したフミコーラ・インソレンスによって発現させた N C E 5 の培養上清液を用いて、界面活性剤及びゴムボールとともに大型ワッシャー中で毛羽立たせた綿ニット生地 (2cm×15cm) の毛羽除去処理を下記の条件に行なった。形成された毛羽が完全に除去されるのに要するタンパク質量を求めた。

試験機械：洗濯堅牢度試験機 L-12 (大栄科学精器製作所社製)

温度 : 40℃

時間 : 120 分

反応液量 : 40 ml

反応 pH : pH 9.3 (5mM 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液)

(ノニオン性界面活性剤)

パーソフトNK-100 (日本油脂 (株) 社製) 0.20g/L

(アニオン性界面活性剤)

LAS (和光純薬 (株) 社製) 0.10g/L

処理液には、エンドグルカナーゼ溶液とともにゴムボールを適量加えた。

その結果は、45 mg/L のタンパク濃度で毛羽が完全に除去され、着色布の澄明化が可能となった。

また、JIS L1096 号にある 45° カンチレバー法に従い、綿ニットの剛軟性を測定した。その結果、酵素を添加せず処理したものは綿ニット試験片が移動した長さが 127 mm であったのに対して、NCE 5 を 15 mg/L (タンパク濃度) 添加して処理したものは綿ニット試験片が移動した長さが 81 mm と明らかに柔軟化していることが認められた。

〔実施例 10〕 フミコーラ・インソレンスによって発現された NCE 5 の紙パルプのろ水性改善評価

乾燥重量 6 g の広葉樹由来の未漂白クラフトパルプに NCE 5 を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液をタンパク質量で 60  $\mu$ g 加え、270 ml の 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で、50°C、1 時間反応した。10 分間煮沸して、酵素を失活させた後、JIS P-8121 にしたがって、ろ水度 (CSF) を測定した。

その結果は第 3 表に示される通りであった。

第 3 表

試料	CSF (ml)
酵素無添加区	492
NCE 5 を発現させたフミコーラ・インソレンス培養液	519

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として取り入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明のエンドグルカナーゼ酵素 NCE 5 は、洗剤組成物に使用される他、古紙の脱インキ、紙パルプのろ水性の改善、並びにセルロース含有繊維の毛羽立ちの低減、肌触りおよび外観の改善、色の澄明化、色の局所的変化、ごわつきの低減等に有用である。

## 請求の範囲

1. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の一部もしくは 19～223 の配列を含んでなる、エンドグルカナーゼ活性を示すタンパク質、またはエンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク。
2. 配列番号 1 に記載される 1～18 のアミノ酸配列の一部または全部を N 末端側に更に有してなる請求項 1 記載のタンパク質、またはその改変タンパク質。
3. 糸状菌由来である、請求項 1 または 2 に記載の酵素。
4. 糸状菌がフミコーラ (Humicola) 属である、請求項 3 に記載の酵素。
5. 糸状菌がフミコーラ・インソレンス (Humicola insolens) に属する糸状菌である、請求項 4 に記載の酵素。
6. 請求項 1～5 のいずれか一項に記載のタンパク質または酵素をコードする DNA 配列を含んでなる、DNA 構成物。
7. 配列番号 2 に記載の DNA 配列、またはその改変配列を含んでなる、DNA 構成物。
8. 請求項 6 または 7 に記載の DNA 配列を含んでなる、発現ベクター。
9. 請求項 8 に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。
10. 宿主細胞が酵母または糸状菌である請求項 9 に記載の宿主細胞。
11. 酵母が、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、ハンゼヌラ (Hansenula) 属またはピキア (Pichia) 属に属するものである、請求項 10 に記載の宿主細胞。
12. 酵母が、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) である請求項 11 に記載の宿主細胞。
13. 糸状菌が、フミコーラ (Humicola) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属、フザリウム (Fusarium) またはアクレモニウム (Acremonium) 属に属するものである、請求項 10 に記載の宿主細胞。
14. 糸状菌が、フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens)、アス

ペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) もしくはアスペルギルス・オリゼー (Aspergillus oryzae)、トリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride)、フザリウム・オキシスポーラム (Fusarium oxysporum)、またはアクレモニウム・セルロリティカス (Acremonium cellulolyticus) である、請求項 10 に記載の宿主細胞。

15. 請求項 9 ～ 14 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養し、その宿主および/またはその培養物から請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質を採取する工程を含んでなる、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質または酵素の製造法。

16. 請求項 15 に記載の方法で生産された、エンドグルカナーゼ酵素。

17. 請求項 1 ～ 5 及び請求項 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質または酵素を含んでなる、セルラーゼ調製物。

18. セルロース含有繊維の処理方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 ～ 5 および請求項 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

19. セルロース含有繊維が毛羽立ち始める速度を低減するかまたはセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減させる方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 ～ 5 および 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

20. セルロース含有繊維の肌触りおよび外観の改善を目的として減量加工する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 ～ 5 および請求項 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

21. 着色されたセルロース含有繊維の色を澄明化する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1 ～ 5 および 16 のいずれか一項

に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

22. 着色されたセルロース含有繊維の色の局所的な変化を提供する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1～5 および請求項 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

23. セルロース含有繊維がごわ付き始める速度を低減するかまたはセルロース含有繊維のごわ付きを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～5 および 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

24. 繊維の処理がその繊維の浸漬、洗濯、またはすすぎを通じて行われる、請求項 18～23 のいずれか一項に記載の方法。

25. 請求項 1～5 および 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物を、飛散性のない顆粒状または安定化された液体状で含有してなる、洗剤添加物。

26. 請求項 1～5 および 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物を含んでなる、洗剤組成物。

27. 古紙を脱インキ薬品により処理して脱インキを行なう工程において、請求項 1～5 および 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物を用いることを特徴とする古紙の脱インキ方法。

28. 紙パルプのろ水性の改善方法であって、紙パルプを、請求項 1～5 および 16 のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項 17 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

29. 動物飼料の消化能を改善する方法であつて、セルロース含有繊維を、請求項1～5および16のいずれか一項に記載のタンパク質、その改変タンパク質もしくは酵素、または請求項17に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

図 1

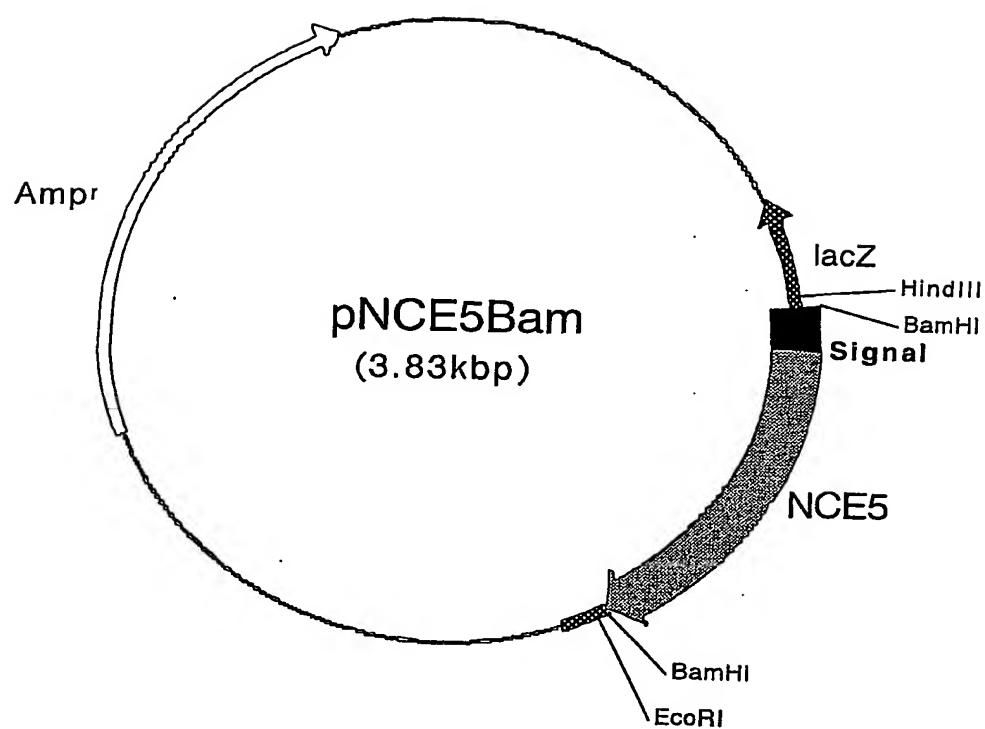
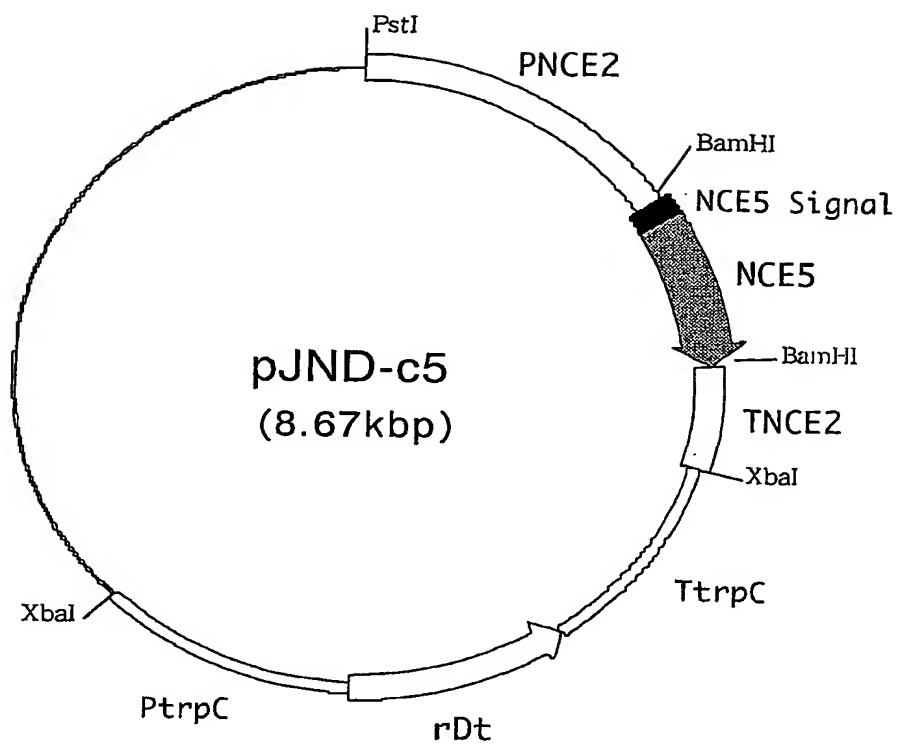


図 2





## SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

<120> Cellulase Preparation Containing Endoglucanase Enzyme  
NCE5.

<130> PH-1228-PCT

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> Humicola insolens

<400> 1

Met Gln Leu Pro Leu Thr Thr Leu Leu Thr Leu Leu Pro Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ala Ala Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys

20 25 30

Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr

35 40 45

Cys Asp Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser

50 55 60

Gly Cys Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro

65 70 75 80

Trp Ala Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile

85 90 95

Ala Gly Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr

100 105 110

Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser

115 120 125

Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro

130 135 140

Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala

145 150 155 160

Pro Pro Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His

165 170 175

Glu Cys Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg

180 185 190

Phe Asp Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln

195

200

205

Val Ser Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg

210

215

220

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 672

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Humicola insolens

&lt;400&gt; 2

atgcagctcc cctgaccac gctectcacc ctctccccc cctcgcggc ggcccagtc 60  
 ggcagcggcc gcaccacgcg ctactgggac tgctgcaagc cgtcgtgcgc gtggcccggc 120  
 aagggcccg cgccgtgcg gacgtgcgac cggcgggaca acccgctgtt cgacggcggc 180  
 aacacgcgca gcgggtgcga cgcgggcggc ggcgcctaca tgtgctcgga ccagagccc 240  
 tgggcgggtca gcgacgacct ggcgtacggc tgggcggccg tcaacattgc cggtccaac 300  
 gagaggcagt ggtgctgcgc ctgctacgag ctgacctca ccagcgggc ggtggcggc 360  
 aagaggatga ttgtgcaggc gagcaacacg ggaggcgatt tggggaacaa ccactttgat 420  
 attgctatgc ccggcggtgg cgtcgggtatc ttcaacgcct gcaccgacca gtacggcgcg 480  
 ccccccaacg gctggggcca gcgctacggc ggcacagcc aacgccacga gtgcgacgc 540  
 ttccccgaga agctcaagcc cggctgctac tggcgcttg actggttct caacccgac 600  
 aaccgagcg tcaactggcg gcaggtcagc tgcccggccg agattgtggc caagagcggc 660  
 tgctcgcgtt aa 672

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Humicola insolens

&lt;400&gt; 3

Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser

1 5 10 15

Cys Ala Trp Pro

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Humicola insolens

&lt;400&gt; 4

Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg

1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Humicola insolens

&lt;400&gt; 5

Tyr Trp Asp Cys Cys Lys

1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Humicola insolens

<400> 6

Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg

1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Humicola insolens

<400> 7

Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr

1 5 10

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Humicola insolens

<400> 8

Phe Asp Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg

1 5 10 15

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

taytgggayt gytgyaarcc

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<220>

<221> n

<222> 3

<223> inosine

<220>

<221> n

<222> 9

<223> inosine

<400> 10

tcngcrttna rraaccartc

20

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 11

ggggatcctg ggacaagatg cagctcccc tgaccacg

38

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 12

ggggatcctg catttaacgc gagcagccgc tcttggcc

38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04272

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/56, C12N9/42, C12N1/15, C12N1/19, C12P21/02, C11D3/386,  
D06M16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/56, C12N9/24~9/42, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq  
BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 96/29397, A1 (NOVO-NORDISK AS), 26 September, 1996 (26.09.96), & EP, 815209, A1 & US, 6001639, A & JP, 11-502701, A	1-29
X	WO, 00/20555, A2 (EMALFARB M A), 13 April, 2000 (13.04.00), & AU, 9962326, A	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 June, 2001 (25.06.01)Date of mailing of the international search report  
03 July, 2001 (03.07.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - <http://www.sughrue.com>



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1<sup>7</sup> C12N15/56, C12N9/42, C12N1/15, C12N1/19, C12P21/02  
, C11D3/386, D06M16/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1<sup>7</sup> C12N15/56, C12N9/24~9/42, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq  
BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 96/29397, A1 (NOVO-NORDISK AS) 26. 9月. 1996 (26. 09. 96) & EP, 815209, A1 & U S, 6001639, A & JP, 11-502701, A	1-29
X	WO, 00/20555, A2 (EMALFARB M A) 13. 4月. 2 000 (13. 04. 00) & AU, 9962326, A	1-29

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 06. 01

国際調査報告の発送日

03.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)